

New polyepitopic fragments from human papilloma virus E6 and E7 proteins, useful for treatment or prevention of e.g. cervical neoplasia and cancer

Patent number: FR2794371
Publication date: 2000-12-08
Inventor: CHOPPIN JEANNINE; BOURGAULT VILLADA ISABELLE; GUILLET JEAN GERARD; CONNAN FRANCINE; FERRIES ESTELLE
Applicant: BIOVECTOR THERAPEUTICS (FR)
Classification:
- **international:** C07K14/025; A61K38/00; A61K39/00; C07K14/005; A61K38/00; A61K39/00; (IPC1-7): A61K39/12; A61K39/42; A61K48/00; A61P31/20; A61P35/00; C07K14/025; C07K16/08; C12N15/37
- **european:** C07K14/025
Application number: FR19990012511 19991007
Priority number(s): FR19990012511 19991007

[Report a data error here](#)

Abstract of FR2794371

Polyepitopic fragments (I) from the E6 and E7 proteins of human papilloma virus (HPV), are new. Polyepitopic fragments (I) from the E6 and E7 proteins of human papilloma virus (HPV), are new. (I) is contained within any of the sequences:
ArgProArgLysLeuProGlnLeuCysThrGluLeuGlnThrThrIleHisAspIleLeuLeu-
GluCysValTyrCysLysGlnGlnLeu;
ArgArgGluValTyrAspPheAlaPheArgAspLeuCysIleValTyrArgAspGlyAsn- ProTyr;
IleSerGluTyrArgHisTyrCysTyrArgLeuTyrGlyThrThrLeuGluGlnGlnTyrAsn- LysProLeuCysAspLeuLeulle;
CysProGluGluLysGlnArgHisLeuAspLysLysGlnArgPheHisAsnIleArgGlyArg- Trp;
GlyGlyAspThrProThrLeuHisGluTyrMetLeuAspLeuGlnProGluThrThrAspLeu-
TyrCysTyrGlnAlaGluProAspArgAlaHisTyrAsnIleValThrPheCysCysLys; and
LeuGlnAspLeuLeuMetGlyThrLeuGlyIleValCysProlleCysSerGlnLys. These represent, respectively, amino acids 15-44, 46-67, 80-108 or 118-139 of E6 or 2-25, 44-60 or 79-97 of E7, and bind stably to, respectively, the human leukocyte antigen (HLA) type molecules A2, A11, A29, B7, B8, B35, B44 or B51; A2, A3, A11, A24, A29, B7, B27, B35, B44 or B51; A1, A3, A11, A24, A29, B7, B18, B35, B44 or B51; A24, B8, B18, B27, B35, B44 or B51; A1, A2, B18, B35, B44 or B62; A1, A3, A11, A29, B7, B18, B35, B44 or B51; or A2, A3, A11, A29 or B44. Alternatively, (I) comprises their derivatives which bind to the same HLA molecules as the parent compounds, formed by substitution, deletion and/or addition of one or more amino acids, modification of at least one peptide bond (particularly replacement by retro or retro-inverso bonds) and/or substitution of at least one amino acid by a non-proteinogenic amino acid. Independent claims are also included for the following: (1) nucleic acid (II) that encodes (I) or its derivatives; (2) mono- or poly-clonal antibodies (Ab) directed against (I) or its derivatives; and (3) pharmaceutical composition or vaccine containing at least one (I), or its derivative, (II) or Ab.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 794 371

②1 N° d'enregistrement national : 99 12511

⑤1 Int Cl⁷ : A 61 K 39/12, A 61 K 48/00, 39/42, C 07 K 14/025, 16/08, C 12 N 15/37, A 61 P 31/20, 35/00

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 07.10.99.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la demande : 08.12.00 Bulletin 00/49.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du présent fascicule*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux apparentés : Division demandée le 07/10/99 bénéficiant de la date de dépôt du 03/06/99 de la demande initiale n° 99 07012.

⑦1 Demandeur(s) : BIOVECTOR THERAPEUTICS
Société anonyme — FR et INSTITUT NATIONAL DE LA
SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE INSERM
— FR.

⑦2 Inventeur(s) : CHOPPIN JEANNINE, BOURGALT
VILLADA ISABELLE, GUILLET JEAN GERARD, CON-
NAN FRANCINE et FERRIES ESTELLE.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : GROSSET FOURNIER ET DEMACHY SARL.

⑤4 FRAGMENTS PROTEIQUES POLYPEPTIDIQUES, LEUR OBTENTION ET LEURS UTILISATIONS NOTAMMENT EN VACCINATION.

⑤7 La présente invention a pour objet l'utilisation de fragments polyépitopiques d'une protéine déterminée pour la préparation de médicaments destinés à la prévention ou au traitement de pathologies dans lesquelles ladite protéine est reconnue par le système immunitaire cellulaire, lesdits fragments polyépitopiques étant tels que leur acide aminé N-terminal correspond à l'acide aminé N-terminal de l'épitope situé en amont d'un ou plusieurs autres épitopes d'une région polyépitopique de ladite protéine, et leur acide aminé C-terminal correspond à l'acide aminé C-terminal de l'épitope situé en aval d'un ou des épitopes susmentionnés de ladite région polyépitopique.

L'invention a également pour objet des fragments protéiques polyépitopiques, leur procédé d'obtention, et leurs utilisations, notamment dans le domaine de la vaccination.

FR 2 794 371 - A1



FRAGMENTS PROTEIQUES POLYEPITOPIQUES, LEUR OBTENTION ET LEURS UTILISATIONS NOTAMMENT EN VACCINATION

5 La présente invention a pour objet des fragments protéiques polyépitopiques, leur procédé d'obtention, et leurs utilisations, notamment dans le domaine de la vaccination thérapeutique ou préventive.

L'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation de fragments polyépitopiques d'une protéine déterminée pour la préparation de médicaments destinés à la prévention ou au traitement de pathologies dans lesquelles ladite protéine est reconnue par le système immunitaire cellulaire.

10 Avantageusement, lesdits fragments polyépitopiques sont tels que leur acide aminé N-terminal correspond à l'acide aminé N-terminal de l'épitope situé en amont d'un ou plusieurs autres épitopes d'une région polyépitopique de ladite protéine, et leur acide aminé C-terminal correspond à l'acide aminé C-terminal de l'épitope situé en aval du ou des épitopes susmentionnés de ladite région polyépitopique.

15 Ainsi, les fragments protéiques polyépitopiques susmentionnés de la présente invention correspondent avantageusement aux régions polyépitopiques d'une protéine déterminée, à savoir aux régions contenant plusieurs épitopes reconnus par les cellules T en association avec les différentes molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), lesdites régions étant sélectionnées parmi celles ayant la caractéristique d'être dégradées *in vitro* en peptides plus courts par des protéasomes, tel que le protéasome 20S, lorsque le fragment protéique testé est mis en présence dudit protéasome, notamment selon la méthode détaillée suivante. Le fragment protéique (environ 75 µg lorsqu'il s'agit d'un polypeptide d'environ 30 acides aminés) est incubé à 37°C avec environ 15µg de protéasome 20S (Calbiochem Ref 539150, La Jolla, CA, USA) dans 500 µl du tampon suivant : 20 mM Tris-HCl pH8, 0,5 mM EDTA et 0,035 % SDS. Des aliquots de 50 µl sont prélevés après des temps d'incubation de 24 et 48 heures, et sont analysés par chromatographie liquide haute pression (HPLC). Les produits de digestion des protéasomes sont séparés par RP-HPLC (Perkin Elmer) en utilisant une colonne C18 et un gradient acétonitrile (de 0 à 100 % contenant 0,1 % d'acide trifluoroacétique, en 90 mn, taux d'élution 0,8 ml/mn). Les produits de clivage sont détectés à 214 nm par un détecteur à absorption (759A, Applied Biosystems).

Avantageusement les régions polyépitopiques définies ci-dessus possèdent la caractéristique de contenir des acides aminés hydrophobes.

Les différents épitopes de la région polyépitopique de la protéine déterminée, et délimitant les fragments protéiques polyépitopiques, sont avantageusement sélectionnés
5 parmi les peptides ;

- se liant à une molécule déterminée du CMH, notamment à une molécule de type HLA déterminé, et ce jusqu'à des concentrations d'environ 10^{-6} M à environ 10^{-10} M en peptide pour des concentrations d'environ 10^{-7} M en molécule HLA, notamment dans les conditions décrites ci-après,

- et formant un complexe stable avec cette molécule du CMH, à savoir notamment un complexe dans lequel ledit peptide reste lié à ladite molécule pendant au moins environ 3 heures à 37°C.

A titre d'illustration, les épitopes susmentionnés de l'invention sont sélectionnés parmi les peptides susceptibles :

- d'une part de s'associer avec les molécules du CMH, notamment par mise en oeuvre de la méthode suivante :

- . incubation (notamment pendant environ 2 heures à 25°C, puis environ 15 heures à 4°C) du peptide en présence de molécules du CMH, provenant de la lyse de cellules humaines ou animales, ou purifiées notamment par chromatographie d'affinité à partir de lignées cellulaires humaines ou animales,

- . piégeage des complexes formés lors de l'étape précédente sur un support solide recouvert d'un premier anticorps, notamment monoclonal, reconnaissant spécifiquement les molécules du CMH dans leur conformation dépendante de leur liaison audit peptide,

- . addition sur le support solide précédent d'un deuxième anticorps marqué, notamment par couplage à un marqueur radioactif, enzymatique ou fluorescent, ledit anticorps marqué reconnaissant spécifiquement soit les chaînes lourdes du CMH dans leur conformation dépendante de leur liaison au peptide, soit la chaîne légère du CMH ou la β 2-microglobuline se liant spécifiquement aux différentes chaînes lourdes du CMH dans leur conformation susmentionnée,

- . détection, après rinçage du support solide, de l'éventuelle présence du deuxième anticorps marqué resté fixé sur le support solide, témoignant d'un effet d'association entre les molécules du CMH et le peptide étudié,

- et, d'autre part, de former un complexe avec lesdites molécules du CMH, dont la stabilité peut être évaluée par mise en oeuvre d'une méthode de suivi dans le temps de la liaison établie entre le peptide et les molécules du CMH, cette méthode étant avantageusement effectuée selon un protocole identique à la méthode précédente, mais dans laquelle l'étape d'incubation du peptide en présence des molécules du CMH sur le support solide recouvert dudit premier anticorps, est précédée par une étape préalable d'élimination du peptide libre susceptible d'être présent dans le milieu réactionnel, notamment par lavage du support solide, ladite étape d'incubation étant effectuée (avantageusement à une température de 37°C) pendant des temps variables de 1h, 3h, 5h, 24h et 48h.

Comme mentionné ci-dessus, les épitopes de l'invention doivent être reconnus par les cellules T en association avec les molécules du CMH et s'associer à ces dernières, notamment dans le cadre de la mise en oeuvre du test de reconnaissance décrit ci-dessus. Cette association peut être faible (détectable à des concentrations en analogues peptidiques de l'ordre de 10^{-4} à 10^{-5} M), intermédiaire (détectable à des concentrations en analogues peptidiques de l'ordre de 10^{-6} à 10^{-7} M), ou forte (détectable à des concentrations en analogues peptidiques de l'ordre de 10^{-8} à 10^{-9} M). Les peptides associés aux molécules du CMH dans le cadre de la présente invention sont de préférence susceptibles de se lier pendant au moins environ 3 heures auxdites molécules du CMH.

L'invention a plus particulièrement pour objet les épitopes (encore désignés peptides ci-dessus et ci-après) tels que décrits ci-dessus et caractérisés en ce qu'ils sont sélectionnés parmi ceux susceptibles :

- d'induire *in vitro* la cytolyse par des lymphocytes T cytotoxiques, de cellules cibles présentant à leur surface le peptide susmentionné associé aux molécules du CMH, lesdits lymphocytes T cytotoxiques étant avantageusement prélevés sur un patient atteint d'une pathologie dans laquelle est impliqué le peptide étudié,

- et d'induire *in vitro* la sécrétion de cytokines (ou interleukines) par les lymphocytes T cytotoxiques susmentionnés, notamment IL-2, IL-4 ou l'interféron γ .

Le cas échéant, les épitopes susmentionnés sont choisis parmi ceux capables d'induire *in vitro* l'apparition et la croissance de lymphocytes T cytotoxiques à partir de cellules humaines ou animales, notamment à partir de cellules mononucléées issues du

sang périphérique (PBMC), en présence de facteurs nécessaires à la croissance et la différenciation des cellules T cytotoxiques.

Les fragments protéiques polyépitopiques de l'invention sont davantage caractérisés en ce qu'ils sont susceptibles de contenir des épitopes CD4 reconnus par les cellules T auxiliaires en association avec les molécules du CMH de classe II, cette propriété favorisant l'induction et le maintien des cellules T CD8⁺ reconnaissant les épitopes compris dans lesdits fragments.

L'invention a plus particulièrement pour objet les fragments polyépitopiques de la protéine E6 de HPV, choisis parmi ceux comprenant :

- le fragment délimité par les acides aminés situés aux positions 15 et 44 de la séquence peptidique de la protéine E6, et caractérisé par la séquence peptidique suivante:

(15)RPRKLPQLCTELQTTIHDILECVYCKQQL(44)

ledit fragment contenant des peptides se liant de façon stable aux molécules HLA de type A2, A11, A29, B7, B8, B35, B44, ou B51,

- le fragment délimité par les acides aminés situés aux positions 46 et 62, ou aux positions 46 et 67, ou aux positions 46 et 77 de la séquence peptidique de la protéine E6, ce dernier fragment étant caractérisé par la séquence peptidique suivante:

(46)RREVYDFAFRDLCIVYRDGNPYAVCDKCLKFY(77)

ledit fragment contenant des peptides se liant de façon stable aux molécules HLA de type A2, A3, A11, A24, A29, B7, B27, B35, B44, ou B51,

- le fragment délimité par les acides aminés situés aux positions 80 et 108 de la séquence peptidique de la protéine E6, et caractérisé par la séquence peptidique suivante:

(80)ISEYRHYCYRLYGTTLEQQYNKPLCDLLI(108)

ledit fragment contenant des peptides se liant de façon stable aux molécules HLA de type A1, A3, A11, A24, A29, B7, B18, B35, B44, ou B51,

- le fragment délimité par les acides aminés situés aux positions 118 et 139 de la séquence peptidique de la protéine E6, et caractérisé par la séquence peptidique suivante:

(118)CPEEKQRHLDKKQRFHNIRGRW(139)

ledit fragment contenant des peptides se liant de façon stable aux molécules HLA de type A24, B8, B18, B27, B35, B44, ou B51.

L'invention a également pour objet les fragments polyépitopiques de la protéine E7 de HPV, choisis parmi ceux comprenant :

- le fragment délimité par les acides aminés situés aux positions 2 et 25 de la séquence peptidique de la protéine E7, et caractérisé par la séquence peptidique suivante:

(2)GGDTPTLHEYMLDLQPETTDLYCY(25)

ledit fragment contenant des peptides se liant de façon stable aux molécules HLA de type A1, A2, B18, B35, B44, ou B62,

- le fragment délimité par les acides aminés situés aux positions 44 et 60 de la séquence peptidique de la protéine E7, et caractérisé par la séquence peptidique suivante:

(44)QAEPDRAHYNIVTFCCK(60)

ledit fragment contenant des peptides se liant de façon stable aux molécules HLA de type A1, A3, A11, A29, B7, B18, B35, B44, ou B51,

- le fragment délimité par les acides aminés situés aux positions 79 et 97 de la séquence peptidique de la protéine E7, ce dernier fragment étant caractérisé par la séquence peptidique suivante:

(79)LEDLLMGTLGIVCPICSQK(97)

ledit fragment contenant des peptides se liant de façon stable aux molécules HLA de type A2, A3, A11, A29, ou B44.

L'invention concerne également les fragments polyépitopiques de la protéine p53 humaine, surexprimée dans de nombreux type de cancers, choisis parmi ceux comprenant :

- le fragment délimité par les acides aminés situés aux positions 106 et 137, ou aux positions 102 et 137 de la séquence peptidique de la protéine p53, ce dernier fragment étant caractérisé par la séquence peptidique suivante:

(102)TYQGSYGFRLGFLHSGTAKSVTCTYSPALNKMFCQL(137)

ledit fragment contenant des peptides se liant de façon stable aux molécules HLA de type A2, A24, ou B62,

- le fragment délimité par les acides aminés situés aux positions 149 et 169 de la séquence peptidique de la protéine p53, et caractérisé par la séquence peptidique suivante:

(149)STPPPGTRVRAMAIYKQSQHM(169)

ledit fragment contenant des peptides se liant de façon stable aux molécules HLA de type A2, A3, A24, B27, B35, ou B62,

- le fragment délimité par les acides aminés situés aux positions 187 et 212, ou aux positions 187 et 220 de la séquence peptidique de la protéine p53, ce dernier fragment étant caractérisé par la séquence peptidique suivante:

(187)GLAPPQHLLRVEGNLRVEYLDDRNTFRHSVVVPY(220)

ledit fragment contenant des peptides se liant de façon stable aux molécules HLA de type A2, A24, B27, ou B44,

- le fragment délimité par les acides aminés situés aux positions 226 et 243 de la séquence peptidique de la protéine p53, et caractérisé par la séquence peptidique suivante:

(226)GSDCTTIHYNMCMSSCM(243)

ledit fragment contenant des peptides se liant de façon stable aux molécules HLA de type A1, A24, ou B44,

- le fragment délimité par les acides aminés situés aux positions 249 et 273 de la séquence peptidique de la protéine p53, et caractérisé par la séquence peptidique suivante:

(249)RPILTIITLEDSSGNLLGRNSFEVR(273)

ledit fragment contenant des peptides se liant de façon stable aux molécules HLA de type A2, B27, B35, B44, ou B62.

L'invention a également pour objet les fragments polyépitopiques de la protéine Nef de HIV, choisis parmi ceux comprenant :

- le fragment délimité par les acides aminés situés aux positions 68 et 97 de la séquence peptidique de la protéine Nef, et étant caractérisé par la séquence peptidique suivante:

(68)FPVTPQVPLRPMTYKAAVDLSHFLKEKGGL(97)

ledit fragment contenant des peptides se liant de façon stable aux molécules HLA de type A2, A3, A11, B7, B8, B14, B35, B62, ou Cw8,

- le fragment délimité par les acides aminés situés aux positions 116 et 145, ou aux positions 105 et 145 de la séquence peptidique de la protéine Nef, et étant caractérisé par la séquence peptidique suivante:

(105)RRQDILDLWIYHTQGYFPDWQNYTPGPGVRYPLTFGWICYKL(145)

ledit fragment contenant des peptides se liant de façon stable aux molécules HLA de type A1, A2, A24, A32, B7, B18, B27, B35, B37, B49, B57/58, ou B62,

- le fragment délimité par les acides aminés situés aux positions 180 et 203 de la séquence peptidique de la protéine Nef, et étant caractérisé par la séquence peptidique suivante:

(180)VLEWRFD SRLAFHHVARELHPEY(202)

5 ledit fragment contenant des peptides se liant de façon stable aux molécules HLA de type A1, A2, A3, B8, B35, ou B52.

L'invention a également pour objet les séquences peptidiques dérivées des fragments polyépitopiques susmentionnés, notamment ;

10 - par substitution, et/ou suppression, et/ou addition d'un ou plusieurs acides aminés, des fragments susmentionnés, et/ou

- par modification d'au moins une liaison peptidique -CO-NH- de la chaîne peptidique des fragments susmentionnés, notamment par introduction d'une liaison du type rétro, ou rétro-inverso, et/ou

15 - par substitution d'au moins un acide aminé de la chaîne peptidique de la séquence ou du fragment susmentionnés, par un acide aminé non protéinogénique,

lesdites séquences dérivées contenant des peptides ou pseudopeptides se liant spécifiquement à la ou aux mêmes molécules du CMH que celles se liant aux peptides contenus dans les fragments polyépitopiques susmentionnés dont elles dérivent.

20 Par séquence dérivée par introduction d'une liaison rétro-inverso, il faut entendre tout analogue peptidique d'un fragment susmentionné, ledit analogue étant constitué d'une chaîne peptidique dans laquelle l'un au moins des résidus d'une part est lié à au moins un résidu voisin par une liaison -NH-CO-, et d'autre part, est de chiralité opposée à celle de ce même résidu aminoacyle dans la chaîne peptidique du peptide parent (à savoir du fragment susmentionné dont elle dérive).

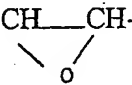
25 Par séquence dérivée par introduction d'une liaison rétro, il faut entendre tout analogue peptidique d'un fragment susmentionné, ledit analogue étant constitué d'une chaîne peptidique dans laquelle l'un au moins des résidus, est lié à au moins un résidu voisin par une liaison -NH-CO-, la chiralité de la totalité des résidus aminoacyles impliqués dans au moins une liaison -NH-CO- étant conservée par rapport aux résidus correspondant de la chaîne peptidique du peptide parent.

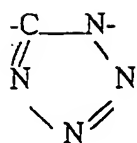
30 Il va de soi que les liaisons -CO-NH- et -NH-CO- doivent être prises en compte dans ce qui précède, dans le sens de la chaîne peptidique parente allant de l'extrémité aminoterminal (N-terminale) vers l'extrémité carboxyterminale (C-terminale).

Par "acide aminé protéinogénique", on entend, dans ce qui précède, tout acide aminé entrant dans la constitution d'une protéine ou d'un peptide naturel.

Par "acide aminé non protéinogénique", on entend par opposition à la définition précédente, tout acide aminé n'entrant pas dans la constitution d'une protéine ou d'un peptide naturel. On entend plus particulièrement par "acide aminé non protéinogénique", tout acide aminé dont le carbone portant la chaîne latérale R, à savoir le groupe $-\text{CHR}-$, situé entre $-\text{CO}-$ et $-\text{NH}-$ dans la chaîne peptidique naturelle, est remplacé par un motif n'entrant pas dans la constitution d'une protéine ou d'un peptide naturel.

L'invention a plus particulièrement pour objet les séquences dérivées telles que décrites ci-dessus, caractérisés en ce que l'une au moins des liaisons peptidiques $-\text{CO}-\text{NH}-$ de la chaîne peptidique du peptide parent est remplacée par une liaison différente de la liaison $-\text{CO}-\text{NH}-$, ladite liaison différente étant notamment choisie parmi les suivantes :

15	$-\text{CH}_2-\text{NH}-$	(méthylène amino) ;
	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$	(carba) ;
	$-\text{CO}-\text{CH}_2-$	(cétométhylène) ;
	$-\text{CH}_2-\text{O}-$	(méthylène-oxy) ;
	$-\text{CHOH}-\text{CH}_2-$	(hydroxyéthylène) ;
20	$-\text{CHOH}-\text{CHOH}-$	(di-hydroxyéthylène) ;
	$-\text{CH}=\text{CH}-$	(E ou Z oléfine) ;
	$-\text{CHCN}-\text{NH}-$	(cyanométhylène amino) ;
	$-\text{S}-\text{CH}_2-$	(thiométhylène) ;
	$-\text{CH}_2-\text{S}-$	(méthylène thio) ;
25	$-\text{CS}-\text{NH}-$	(thioamide) ;
	$-\text{PO}_2-\text{NH}-$	(phosphonamide) ;
	$-\text{CHOH}-$	(hydroxyméthylène) ;
	$-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}-$	(urée) ;
30	$-\text{CH}-\text{CH}-$ 	(oxirane) ;



(tétrazole) ;

-CH₂-CO-NH-

(β-homologation) ;

-CHOH-CH₂-NH-

(hydroxyéthylène amino) ;

-CO-NH-NH-

(hydrazino).

L'invention concerne également les séquences nucléotidiques codant pour les fragments protéiques polyépitopiques ou pour les séquences peptidiques dérivées susmentionnés.

L'invention a également pour objet tout vecteur, notamment plasmide, cosmide ou phage, contenant au moins une séquence nucléotidique susmentionnée placée sous le contrôle des éléments nécessaires à la transcription de ladite séquence, notamment sous le contrôle d'un promoteur et d'un terminateur de transcription.

L'invention concerne également les cellules hôtes, notamment bactéries, virus, levures, cellules eucaryotes, transformées à l'aide d'un vecteur susmentionné selon l'invention, de manière à intégrer de façon stable dans leur génome ou à maintenir de manière stable dans leur cytoplasme, au moins une séquence nucléotidique selon l'invention.

L'invention concerne également tout vecteur comprenant un ou plusieurs fragments polypéptopiques et/ou une ou plusieurs séquences peptidiques dérivées tels que définis ci-dessus, ou tout vecteur comprenant une ou plusieurs séquences nucléotidiques susmentionnées, lesdits vecteurs étant choisis parmi ceux capables d'assurer une protection desdits fragments ou séquences nucléotidiques dans l'organisme et/ou leur pénétration dans les cellules de l'organisme.

Dans le cas de l'utilisation de fragments polyépitopiques et/ou de séquences peptidiques dérivées susmentionnés, de tels vecteurs sont choisis parmi les acides gras (dans le cadre de la préparation de lipopeptides), les liposomes etc.

A ce titre, l'invention a plus particulièrement pour objet tout lipopeptide caractérisé en ce qu'il comprend:

- une partie peptidique comprenant un ou plusieurs fragments protéiques polyépitopiques choisis parmi ceux définis ci-dessus, ou toute séquence peptidique dérivée desdits fragments telle que définie ci-dessus,

- et une ou plusieurs parties lipophiles, avantageusement choisies parmi celles comprenant :

* une chaîne hydrocarbonée en C4 à C20, saturée ou insaturée, linéaire ou ramifiée,

* ou un groupe stéroïde, le cas échéant lié à la chaîne hydrocarbonée susmentionnée,

lesdites parties lipophiles étant éventuellement associées à un court peptide vecteur (pour former ainsi des motifs lipopeptidiques vecteurs) comportant une ou plusieurs fonctions ionisées à pH physiologique, et une fonction permettant la fixation covalente de ladite chaîne hydrocarbonée et/ou dudit groupe stéroïde.

Par partie lipophile, dans ce qui précède et ce qui suit, on entend toute molécule lipophile, insoluble dans l'eau, permettant, lorsqu'elle est liée à la partie peptidique définie ci-dessus, un passage intracellulaire passif du lipopeptide obtenu, grâce aux propriétés hydrophobes de ladite molécule. Avantageusement le lipopeptide résultant de la liaison de la partie lipophile à la partie peptidique, est soluble dans l'eau.

De préférence, la chaîne hydrocarbonée des parties lipophiles, est choisie parmi celles de :

- l'acide palmitique,

- l'acide oléique,

- l'acide linoléique,

- l'acide linoléique.

De préférence également, le groupe stéroïde de la ou des parties lipophiles, est choisi parmi les dérivés du cholestérol tel que l'acide cholest-5-ényl-3-oxy acétique, ou l'acide cholest-5-ényl-3-oxycarbonique.

L'invention a plus particulièrement pour objet tout lipopeptide tel que décrit ci-dessus, caractérisé en ce que la ou les parties lipophiles sont liées de façon covalente à un ou plusieurs acides aminés de la partie peptidique.

Avantageusement, la ou les parties lipophiles sont liées de façon covalente à la fonction αNH_2 ou ϵNH_2 d'une lysine située en position N-terminale ou C-terminale de

la partie peptidique, ou à la fonction thiol d'une cystéine, ou à toute fonction amino, alcool ou thiol éventuellement ajoutée au peptide avec un espaceur simple.

A ce titre, l'invention a plus particulièrement pour objet tout lipopeptide tel que défini ci-dessus, dans lequel la ou les parties lipophiles sont représentées par un groupe

5 N^α-acétyl-Lysine N^ε(palmitoyl) (encore désigné par l'abréviation Ac-K(Pam)).

La présente invention a également pour objet, des micelles ou micro-agrégats d'un ou plusieurs lipopeptides différents définis ci-dessus.

Avantageusement, lesdits micelles ou micro-agrégats ont une taille inférieure à environ 1 μm.

10 De préférence, les micelles ou micro-agrégats selon l'invention, sont tels qu'obtenus par dispersion desdits lipopeptides dans une solution d'acide acétique concentrée à environ 80%, ou tout autre solvant capable d'assurer une dispersion moléculaire des lipopeptides en solution.

Dans le cas de l'utilisation de séquences nucléotidiques définies ci-dessus selon

15 l'invention, les vecteurs susmentionnés sont choisis parmi les virus, notamment les rétrovirus, les adénovirus et les virus associés (AAV Adeno Associated Virus).

L'invention a également pour objet l'utilisation :

- d'au moins un fragment polyépitopique de la protéine E6 d'HPV, et/ou d'au moins un fragment polyépitopique de la protéine E7 d'HPV, tels que définis ci-dessus,

20 - et/ou d'au moins une séquence peptidique dérivée de ces fragments, telle que définie ci-dessus,

- ou d'au moins une séquence nucléotidique, telle que définie ci-dessus, codant pour un fragment polyépitopique de la protéine E6 d'HPV, et/ou pour un fragment polyépitopique de la protéine E7 d'HPV, et/ou pour une séquence peptidique dérivée de ces fragments, tels que définis ci-dessus,

25

pour la préparation d'un médicament ou vaccin destiné à la prévention ou au traitement de pathologies liées à l'infection d'individus par les papillomavirus humains, lesdites pathologies étant notamment les suivantes : les néoplasies cervicales intraépithéliales (CIN), le cancer invasif du col de l'utérus, les néoplasies vulvaires intraépithéliales (VIN).

30

A ce titre, l'invention concerne également les compositions pharmaceutiques, ou les vaccins, caractérisés en ce qu'ils comprennent :

- au moins un fragment polyépitopique de la protéine E6 d'HPV, et/ou au moins un fragment polyépitopique de la protéine E7 d'HPV, tels que définis ci-dessus,

- et/ou au moins une séquence peptidique dérivée de ces fragments, telle que définie ci-dessus,

5 - et/ou au moins un vecteur approprié susmentionné, notamment des lipopeptides et/ou micelles définis ci-dessus, contenant au moins un fragment polyépitopique susmentionné de la protéine E6 ou E7 d'HPV, et/ou au moins une séquence dérivée susmentionnée de ces fragments,

en association avec un véhicule physiologiquement acceptable,

10 ledit fragment protéique polyépitopique et/ou sa séquence dérivée étant le cas échéant associés à un ou plusieurs autres épitopes exogènes reconnus par des cellules T auxiliaires (encore désignés épitopes CD4 ou T helper), lesdits épitopes étant choisis notamment parmi les suivants :

15 - le fragment peptidique délimité par les acides aminés situés aux positions 830 et 846 de la séquence peptidique de la toxine tétanique, ledit fragment répondant à la formule suivante : QYIKANSKFIGITELKK,

- l'hémagglutinine (Prevost-Blondel et al., 1995, J. Virol., 62, n°12, pp 8046-8055),

- l'épitope PADRE (Alexander et al., 1994, Immunity, 1, 751).

20 L'invention concerne également les compositions pharmaceutiques, ou les vaccins, caractérisés en ce qu'ils comprennent :

- au moins une séquence nucléotidique codant pour un fragment polyépitopique de la protéine E6 d'HPV, et/ou pour un fragment polyépitopique de la protéine E7 d'HPV, telle que définie ci-dessus,

25 - et/ou au moins une séquence nucléotidique codant pour une séquence peptidique dérivée de ces fragments, telle que définie ci-dessus,

- et/ou au moins un vecteur approprié susmentionné, choisi notamment parmi les virus définis ci-dessus, contenant au moins une séquence nucléotidique susmentionnée, en association avec un véhicule physiologiquement acceptable.

30 Avantageusement les compositions pharmaceutiques, ou vaccins, susmentionnés, se présentent sous une forme administrable par voie sous-cutanée, notamment à raison de plusieurs injections (avantageusement 3 injections) d'environ 500 µg du fragment polyépitopique sous forme lipopeptidique, à environ un mois d'intervalle.

L'invention a également pour objet l'utilisation :

- d'au moins un fragment polyépitopique de la protéine p53, choisi parmi ceux définis ci-dessus,

- et/ou d'au moins une séquence peptidique dérivée de ce fragment, telle que définie ci-dessus,

5 - ou d'au moins une séquence nucléotidique, telle que définie ci-dessus, codant pour un fragment polyépitopique de la protéine p53, et/ou pour une séquence peptidique dérivée de ce fragment, tels que définis ci-dessus,

pour la préparation d'un médicament ou vaccin destiné à la prévention ou au traitement des cancers, notamment les cancers du sein, du colon, du poulmon, ou de la vessie.

10 A ce titre, l'invention concerne également les compositions pharmaceutiques, ou les vaccins, caractérisés en ce qu'ils comprennent :

- au moins un fragment polyépitopique de la protéine p53, tel que défini ci-dessus,

15 - et/ou au moins une séquence peptidique dérivée de ce fragment, telle que définie ci-dessus,

- et/ou au moins un vecteur approprié, notamment des lipopeptides et/ou micelles définis ci-dessus, contenant au moins un fragment polyépitopique susmentionné de la protéine p53, et/ou au moins une séquence dérivée susmentionnée de ce fragment,

en association avec un véhicule physiologiquement acceptable,

20 ledit fragment protéique polyépitopique et/ou sa séquence dérivée étant le cas échéant associés à un ou plusieurs autres épitopes exogènes reconnus par des cellules T auxiliaires choisis notamment parmi ceux décrits ci-dessus.

L'invention concerne également les compositions pharmaceutiques, ou les vaccins, caractérisés en ce qu'ils comprennent :

25 - au moins une séquence nucléotidique codant pour un fragment polyépitopique de la protéine p53, telle que définie ci-dessus,

- et/ou au moins une séquence nucléotidique codant pour une séquence peptidique dérivée de ces fragments, telle que définie ci-dessus,

30 - et/ou au moins un vecteur approprié susmentionné, choisi notamment parmi les virus définis ci-dessus, contenant au moins une séquence nucléotidique susmentionnée,

en association avec un véhicule physiologiquement acceptable.

Avantageusement les compositions pharmaceutiques, ou vaccins, susmentionnés, se présentent sous une forme administrable par voie sous-cutanée ou intra-musculaire, notamment à raison de plusieurs injections (avantageusement 3 injections) d'environ

500 µg du fragment polyépitopique sous forme lipopeptidique, à environ un mois d'intervalle.

L'invention a également pour objet l'utilisation :

5 - d'au moins un fragment polyépitopique de la protéine Nef de HIV, choisi parmi ceux définis ci-dessus, le cas échéant en association avec un ou plusieurs fragments polyépitopiques d'autres protéines, que la protéine Nef, du virus HIV, notamment d'un ou plusieurs fragments polyépitopiques de la protéine GAG et/ou POL et/ou ENV et/ou RT,

10 - et/ou d'au moins une séquence peptidique dérivée de ce fragment, telle que définie ci-dessus, le cas échéant en association avec un ou plusieurs fragments polyépitopiques d'autres protéines susmentionnées,

- ou d'au moins une séquence nucléotidique, telle que définie ci-dessus, codant pour un fragment polyépitopique de la protéine Nef de HIV, et/ou pour une séquence peptidique dérivée de ce fragment, tels que définis ci-dessus,

15 pour la préparation d'un médicament ou vaccin destiné à la prévention ou au traitement du SIDA.

A ce titre, l'invention concerne également les compositions pharmaceutiques, ou les vaccins, caractérisés en ce qu'ils comprennent :

- au moins un fragment polyépitopique de la protéine Nef, tel que défini ci-dessus,

20 - et/ou au moins une séquence peptidique dérivée de ce fragment, telle que définie ci-dessus,

- et/ou au moins un vecteur approprié, notamment des lipopeptides et/ou micelles définis ci-dessus, contenant au moins un fragment polyépitopique susmentionné de la protéine Nef, et/ou au moins une séquence dérivée susmentionnée de ce fragment,

25 en association avec un véhicule physiologiquement acceptable,

ledit fragment protéique polyépitopique et/ou sa séquence dérivée étant le cas échéant associés à un ou plusieurs autres épitopes exogènes reconnus par des cellules T auxiliaires choisis notamment parmi ceux décrits ci-dessus.

30 L'invention concerne également les compositions pharmaceutiques, ou les vaccins, caractérisés en ce qu'ils comprennent :

- au moins une séquence nucléotidique codant pour un fragment polyépitopique de la protéine Nef, telle que définie ci-dessus,

- et/ou au moins une séquence nucléotidique codant pour une séquence peptidique dérivée de ces fragments, telle que définie ci-dessus,

- et/ou au moins un vecteur approprié susmentionné, choisi notamment parmi les virus définis ci-dessus, contenant au moins une séquence nucléotidique susmentionnée, en association avec un véhicule physiologiquement acceptable.

Avantageusement, les compositions pharmaceutiques, ou vaccins, susmentionnés, se présentent sous une forme administrable par voie sous-cutanée ou intra-musculaire, notamment à raison de plusieurs injections (avantageusement 3 injections) d'environ 500 µg du fragment polyépitopique sous forme lipopeptidique, à environ un mois d'intervalle.

L'invention a également pour objet les peptides de la protéine E6 d'HPV choisis parmi les suivants :

- (19)LPQLCTEL(26) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B51,
- (21)QLCTELQTTI(30) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A2,
- (24)TELQTTIHDI(33) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A29 et B44,
- (33)IILECVYCK(41) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A11,
- (35)LECVYCKQQL(44) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A29 et B44,
- (37)CVYCKQQL(44) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B8,
- (46)RREVDFAFR(55) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B27,
- (49)VYDFAFRDL(57) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A24,
- (50)YDFAFRDL(57) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A29, B44,
- (52)FAFRDLCIV(60) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A2, B35, B51,
- (54)FRDLCIVYR(62) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A3, A11,
- (59)IVYRDGNPY(67) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A3, A11,
- (81)SEYRHYCY(88) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A29, B44,
- (87)CYRLYGTTL(95) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A24,
- (94)TLEQQYNK(101) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A3, A11,
- (95)LEQQYNKPL(103) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A29, B44,
- (101)KPLCDLLI(108) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B7, B35, B51,
- (118)CPEEKQRHL(126) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B8, B18, B35, B51,
- (119)PEEKQRHL(126) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B44,
- (127)DKKQRFHNI(135) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B8,
- (128)KKQRFHNIR(136) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B27,
- (130)QRFHNIRGRW(139) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B27,
- (131)RFHNIRGRW(139) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A24.

L'invention concerne également les peptides de la protéine E7 d'HPV choisis parmi les suivants :

- (2)GGDTPTLHEY(11) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A1,
- (3)GDTPTLHEY(11) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B44,
- 5 - (5)TPTLHEYML(13) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B35,
- (15)LQPETTDLY(23) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B62,
- (16)QPETTDLYCY(25) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A1, B18,
- (45)AEPDRAHY(52) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A29, B44,
- (53)NIVTFCK(60) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A3, A11,
- 10 - (79)LEDLLMGTL(87) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A29, B44,
- (89)IVCPICSQK(97) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A3, A11.

L'invention a également pour objet les peptides de la protéine p53 choisis parmi les suivants :

- (102)TYQGSYGFR(111) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A24,
- 15 - (106)SYGFRLGFL(114) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A24,
- (118)TAKSVTCTY(126) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B62,
- (125)TYSPALNKMF(134) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A24,
- (152)PPGTRVRAM(160) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B35,
- (155)TRVRAMAIYK(164) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B27,
- 20 - (156)RVRAMAIY(163) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B62,
- (162)IYKQSQHM(169) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A24,
- (197)VEGNLRVEY(205) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B44,
- (201)LRVEYLDDR(209) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B27,
- (203)VEYLDDRNTF(212) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B44,
- 25 - (204)EYLDDRNTF(212) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A24,
- (211)TFRHSVVV(218) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A24,
- (212)FRHSVVVPY(220) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B27,
- (226)GSDCTTIHY(234) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A1,
- (227)SDCTTIHYN(236) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B44,
- 30 - (235)NYMCNSSCM(243) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A24,
- (249)RPILTIITL(257) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B35,
- (257)LEDSSGNLL(265) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B44,
- (263)NLLGRNSF(270) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B62,
- (266)GRNSFEVR(273) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B27.

L'invention concerne également les peptides de la protéine Nef d'HIV choisis parmi les suivants :

- (71)TPQVPLRPM(79) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B35,
- (86)DLSHFLKEK(94) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A3,
- 5 - (90)FLKEKGGL(97) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A2, B8,
- (133)VRYPITFGW(141) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A32, B27,
- (188)RLAFHHVAR(196) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A3.

L'invention concerne également les séquences peptidiques dérivées des peptides susmentionnés, lesdites séquences dérivées, ou analogues, étant telles que définies ci-dessus dans le cadre des séquences dérivées des fragments protéiques polyépitopiques susmentionnés.

L'invention a également pour objet les anticorps dirigés contre les fragments protéiques polyépitopiques ou les épitopes ou leurs analogues tels que définis ci-dessus, lesdits anticorps étant tels qu'obtenus par immunisation d'un animal avec au moins un des complexes susmentionnés, lesdits anticorps étant susceptibles de former un complexe avec ces fragments polyépitopiques ou ces épitopes ou leurs analogues.

Les anticorps selon l'invention sont des anticorps polyclonaux ou monoclonaux.

Les anticorps polyclonaux susmentionnés sont obtenus par immunisation d'un animal avec au moins un fragment protéique polyépitopique ou un épitope ou un analogue selon l'invention, suivie de la récupération des anticorps recherchés sous forme purifiée, par prélèvement du sérum dudit animal, et séparation desdits anticorps des autres constituants du sérum, notamment par chromatographie d'affinité sur une colonne sur laquelle est fixée un antigène spécifiquement reconnu par les anticorps, notamment un fragment protéique polyépitopique ou un épitope ou un analogue selon l'invention.

Les anticorps monoclonaux selon l'invention peuvent être obtenus par la technique des hybridomes dont le principe général est rappelé ci-après.

Dans un premier temps, on immunise un animal, généralement une souris, (ou des cellules en culture dans le cadre d'immunisations *in vitro*) avec un fragment protéique polyépitopique ou un épitope ou un analogue selon l'invention, contre lesquels les lymphocytes B de l'animal sont alors capables de produire des anticorps. Ces lymphocytes producteurs d'anticorps sont ensuite fusionnés avec des cellules myélomateuses "immortelles" (notamment murines) pour donner lieu à des hybridomes. A partir du mélange hétérogène des cellules ainsi obtenu, on effectue alors une sélection

des cellules capables de produire un anticorps particulier et de se multiplier indéfiniment. Chaque hybridome est multiplié sous la forme de clones, chacun conduisant à la production d'un anticorps monoclonal dont les propriétés de reconnaissance vis-à-vis du fragment protéique polyépitopique ou épitope ou analogue de l'invention pourront être testées par exemple en ELISA, par immunotransfert en une ou deux dimensions, en immunofluorescence, ou à l'aide d'un biocapteur. Les anticorps monoclonaux ainsi sélectionnés, sont par la suite purifiés notamment selon la technique de chromatographie d'affinité décrite ci-dessus.

L'invention a également pour objet toute composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend un ou plusieurs anticorps tels que définis ci-dessus, en association avec un véhicule physiologiquement acceptable, ainsi que leur utilisation dans le cadre du traitement des pathologies susmentionnées.

L'invention concerne également l'utilisation d'un ou plusieurs anticorps susmentionnés pour la mise en œuvre d'une méthode de diagnostic *in vitro* des pathologies susmentionnées.

A ce titre l'invention a également pour objet des troussees ou kits comprenant lesdits anticorps, pour la mise en œuvre d'une méthode de diagnostic telle que définie ci-dessus.

L'invention a également pour objet tout procédé de préparation de fragments polyépitopiques, d'épitopes simples (peptides susmentionnés), ou de séquences dérivées, par synthèse peptidique classique en phase liquide ou en phase solide.

En variante, les fragments polyépitopiques, épitopes simples, ou séquences peptidiques dérivées, tels que définis ci-dessus selon l'invention, peuvent être obtenus sous forme de polypeptides recombinants par transformation de cellules hôtes appropriées telles que définies ci-dessus à l'aide de vecteurs contenant une séquence nucléotidique recombinante telle que définie ci-dessus selon l'invention, et récupération, le cas échéant après purification, du polypeptide recombinant codé par ladite séquence nucléotidique et produit par les cellules hôtes susmentionnées.

REVENDEICATIONS

1. Utilisation de Fragments polyépitopiques de la protéine E6 ou E7 de HPV, choisis parmi ceux comprenant :

5 - le fragment délimité par les acides aminés situés aux positions 15 et 44 de la séquence peptidique de la protéine E6, et caractérisé par la séquence peptidique suivante:

(15)RPRKLPQLCTELQTTIHDIILECVYCKQQL(44)

10 ledit fragment contenant des peptides se liant de façon stable aux molécules HLA de type A2, A11, A29, B7, B8, B35, B44, ou B51,

 - le fragment délimité par les acides aminés situés aux positions 46 et 62, ou aux positions 46 et 67 de la séquence peptidique de la protéine E6, ce dernier fragment étant caractérisé par la séquence peptidique suivante:

(46)RREVYDFAFRDLCIVYRDGNPY(67)

15 ledit fragment contenant des peptides se liant de façon stable aux molécules HLA de type A2, A3, A11, A24, A29, B7, B27, B35, B44, ou B51,

 - le fragment délimité par les acides aminés situés aux positions 80 et 108 de la séquence peptidique de la protéine E6, et caractérisé par la séquence peptidique suivante:

20 (80)ISEYRHYCYRLYGTTLEQQYNKPLCDLLI(108)

 ledit fragment contenant des peptides se liant de façon stable aux molécules HLA de type A1, A3, A11, A24, A29, B7, B18, B35, B44, ou B51,

25 - le fragment délimité par les acides aminés situés aux positions 118 et 139 de la séquence peptidique de la protéine E6, et caractérisé par la séquence peptidique suivante:

(118)CPEEKQRHLDKKQRFHNIRGRW(139)

 ledit fragment contenant des peptides se liant de façon stable aux molécules HLA de type A24, B8, B18, B27, B35, B44, ou B51,

30 - le fragment délimité par les acides aminés situés aux positions 2 et 25 de la séquence peptidique de la protéine E7, et caractérisé par la séquence peptidique suivante:

(2)GGDTPTLHEYMLDLQPETTDLYCY(25)

 ledit fragment contenant des peptides se liant de façon stable aux molécules HLA de type A1, A2, B18, B35, B44, ou B62,

- le fragment délimité par les acides aminés situés aux positions 44 et 60 de la séquence peptidique de la protéine E7, et caractérisé par la séquence peptidique suivante:

(44)QAEPDRAHYNIVTFCKK(60)

5 ledit fragment contenant des peptides se liant de façon stable aux molécules HLA de type A1, A3, A11, A29, B7, B18, B35, B44, ou B51,

- le fragment délimité par les acides aminés situés aux positions 79 et 97 de la séquence peptidique de la protéine E7, ce dernier fragment étant caractérisé par la séquence peptidique suivante:

10 (79)LEDLLMGTLGIVCPICSQK(97)

ledit fragment contenant des peptides se liant de façon stable aux molécules HLA de type A2, A3, A11, A29, ou B44,

- les séquences peptidiques dérivées des fragments polyépitopiques susmentionnés, notamment ;

15 - par substitution, et/ou suppression, et/ou addition d'un ou plusieurs acides aminés, des fragments susmentionnés, et/ou

- par modification d'au moins une liaison peptidique -CO-NH- de la chaîne peptidique des fragments susmentionnés, notamment par introduction d'une liaison du type rétro, ou rétro-inverso, et/ou

20 - par substitution d'au moins un acide aminé de la chaîne peptidique de la séquence ou du fragment susmentionnés, par un acide aminé non protéinogénique,

lesdites séquences dérivées contenant des peptides ou pseudopeptides se liant spécifiquement à la ou aux mêmes molécules du CMH que celles se liant aux peptides contenus dans les fragments polyépitopiques susmentionnés dont elles dérivent,

25 pour la préparation d'un médicament ou vaccin destiné à la prévention ou au traitement de pathologies liées à l'infection d'individus par les papillomavirus humains, telles que les néoplasies cervicales intraépithéliales (CIN), le cancer invasif du col de l'utérus, les néoplasies vulvaires intraépithéliales (VIN).

30

2. Fragments polyépitopiques de la protéine E6 ou E7 de HPV, choisis parmi ceux comprenant :

- le fragment délimité par les acides aminés situés aux positions 15 et 44 de la séquence peptidique de la protéine E6, et caractérisé par la séquence peptidique suivante:

(15)RPRKLPQLCTELQTTIHDILECVYCKQQL(44)

ledit fragment contenant des peptides se liant de façon stable aux molécules HLA de type A2, A11, A29, B7, B8, B35, B44, ou B51,

- le fragment délimité par les acides aminés situés aux positions 46 et 62, ou aux positions 46 et 67 de la séquence peptidique de la protéine E6, ce dernier fragment étant caractérisé par la séquence peptidique suivante:

(46)RREVYDFAFRDLCIVYRDGNPY(67)

ledit fragment contenant des peptides se liant de façon stable aux molécules HLA de type A2, A3, A11, A24, A29, B7, B27, B35, B44, ou B51,

- le fragment délimité par les acides aminés situés aux positions 80 et 108 de la séquence peptidique de la protéine E6, et caractérisé par la séquence peptidique suivante:

(80)ISEYRHICYRLYGTTLEQQYNKPLCDLLI(108)

ledit fragment contenant des peptides se liant de façon stable aux molécules HLA de type A1, A3, A11, A24, A29, B7, B18, B35, B44, ou B51,

- le fragment délimité par les acides aminés situés aux positions 118 et 139 de la séquence peptidique de la protéine E6, et caractérisé par la séquence peptidique suivante:

(118)CPEEKQRHLDKKQRFHNIRGRW(139)

ledit fragment contenant des peptides se liant de façon stable aux molécules HLA de type A24, B8, B18, B27, B35, B44, ou B51,

- le fragment délimité par les acides aminés situés aux positions 2 et 25 de la séquence peptidique de la protéine E7, et caractérisé par la séquence peptidique suivante:

(2)GGDTPTLHEYMLDLQPETTDLYCY(25)

ledit fragment contenant des peptides se liant de façon stable aux molécules HLA de type A1, A2, B18, B35, B44, ou B62,

- le fragment délimité par les acides aminés situés aux positions 44 et 60 de la séquence peptidique de la protéine E7, et caractérisé par la séquence peptidique suivante:

(44)QAEPDRAHYNIVTFCKK(60)

5 ledit fragment contenant des peptides se liant de façon stable aux molécules HLA de type A1, A3, A11, A29, B7, B18, B35, B44, ou B51,

- le fragment délimité par les acides aminés situés aux positions 79 et 97 de la séquence peptidique de la protéine E7, ce dernier fragment étant caractérisé par la séquence peptidique suivante:

10 (79)LEDLLMGTLGIVCPICKS(97)

ledit fragment contenant des peptides se liant de façon stable aux molécules HLA de type A2, A3, A11, A29, ou B44,

- les séquences peptidiques dérivées des fragments polyépitopiques susmentionnés, notamment ;

15 - par substitution, et/ou suppression, et/ou addition d'un ou plusieurs acides aminés, des fragments susmentionnés, et/ou

- par modification d'au moins une liaison peptidique -CO-NH- de la chaîne peptidique des fragments susmentionnés, notamment par introduction d'une liaison du type rétro, ou rétro-inverso, et/ou

20 - par substitution d'au moins un acide aminé de la chaîne peptidique de la séquence ou du fragment susmentionnés, par un acide aminé non protéinogénique,

lesdites séquences dérivées contenant des peptides ou pseudo-peptides se liant spécifiquement à la ou aux mêmes molécules du CMH que celles se liant aux peptides contenus dans les fragments polyépitopiques susmentionnés dont elles dérivent.

25 3. Séquences nucléotidiques codant pour un fragment polyépitopique ou pour une séquence peptidique dérivée selon la revendication 2.

30 4. Anticorps, polyclonaux ou monoclonaux, dirigés contre un fragment polyépitopique ou contre une séquence peptidique dérivée selon la revendication 2.

5. Composition pharmaceutique, ou vaccin, caractérisés en ce qu'ils comprennent :

* a)

- au moins un fragment polyépitopique de la protéine E6 ou E7 défini dans la revendication 2,

- et/ou au moins une séquence peptidique dérivée de ce fragment, telle que définie dans la revendication 2,

- et/ou au moins un vecteur approprié, notamment des lipopeptides et/ou micelles, contenant au moins un fragment polyépitopique susmentionné de la protéine E6 ou E7, et/ou au moins une séquence dérivée susmentionnée de ces fragments,

en association avec un véhicule physiologiquement acceptable,

ledit fragment protéique polyépitopique et/ou sa séquence dérivée étant le cas échéant associés à un ou plusieurs autres épitopes exogènes reconnus par des cellules T auxiliaires, tels que le fragment peptidique délimité par les acides aminés situés aux positions 830 et 846 de la séquence peptidique de la toxine tétanique, l'hémagglutinine, ou l'épitope PADRE,

* ou b)

- au moins une séquence nucléotidique selon la revendication 3, codant pour un fragment polyépitopique susmentionné de la protéine E6 ou E7,

- et/ou au moins une séquence nucléotidique codant pour une séquence peptidique dérivée de ce fragment, telle que définie ci-dessus,

- et/ou au moins un vecteur approprié susmentionné, choisi notamment parmi les virus, contenant au moins une séquence nucléotidique susmentionnée,

en association avec un véhicule physiologiquement acceptable,

* ou c)

- des anticorps selon la revendication 4, dirigés contre un fragment polyépitopique de la protéine E6 ou E7, et/ou contre une séquence peptidique dérivée de ces fragments, tels que définis ci-dessus.

6. Epitopes de la protéine E6 d'HPV choisis parmi les suivants :

- (19)LPQLCTEL(26) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B51,

- (21)QLCTELQTTI(30) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A2,

- (24)TELQTTIHDI(33) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A29 et B44,

- (33)ILECVYCK(41) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A11,

- (35)LECVYCKQQL(44) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A29 et B44,

- (37)CVYCKQQL(44) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B8,

- (46)RREVDFAFR(55) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B27,
- (49)VYDFAFRDL(57) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A24,
- (50)YDFAFRDL(57) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A29, B44,
- (52)FAFRDLCTV(60) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A2, B35, B51,
- 5 - (54)FRDLCTVYR(62) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A3, A11,
- (59)IVYRDGNPY(67) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A3, A11,
- (81)SEYRHYCY(88) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A29, B44,
- (87)CYRLYGTTL(95) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A24,
- (94)TLEQQYNK(101) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A3, A11,
- 10 - (95)LEQQYNKPL(103) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A29, B44,
- (101)KPLCDLLI(108) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B7, B35, B51,
- (118)CPEEKQRHL(126) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B8, B18, B35, B51,
- (119)PEEKQRHL(126) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B44,
- (127)DKKQRFHNI(135) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B8,
- 15 - (128)KKQRFHNIR(136) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B27,
- (130)QRFHNIRGRW(139) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B27,
- (131)RFHNIRGRW(139) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A24.

7. Epitopes de la protéine E7 d'HPV choisis parmi les suivants :

- 20 - (2)GGDTPTLHEY(11) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A1,
- (3)GDTPTLHEY(11) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B44,
- (5)TPTLHEYML(13) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B35,
- (15)LQPETTDLY(23) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B62,
- (16)QPETTDLYCY(25) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A1, B18,
- 25 - (45)AEPDRAHY(52) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A29, B44,
- (53)NIVTFCK(60) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A3, A11,
- (79)LEDLLMGTL(87) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A29, B44,
- (89)IVCPICSQK(97) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A3, A11.

INSTITUT NATIONAL

de la

PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIREétabli sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

FA 582509

FR 9912511

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	WO 93 22338 A (UNIV LEIDEN ;KAST WYBE MARTIN (NL); MELIEF CORNELIS JOSEPH MARIA () 11 novembre 1993 (1993-11-11) * page 4, ligne 21 - ligne 36 * * page 7, ligne 24 - ligne 32 * ---	1-6
X	EP 0 451 550 A (BEHRINGWERKE AG) 16 octobre 1991 (1991-10-16) * revendication 2 * ---	1-6
X	MÜLLER M ET AL: "IDENTIFICATION OF SEROREACTIVE REGIONS OF THE HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPE 16 PROTEINS E4, E6, E7 AND L1" JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, GB, SOCIETY FOR GENERAL MICROBIOLOGY, READING, vol. 71, 1 janvier 1990 (1990-01-01), pages 2709-2717, XP000318453 ISSN: 0022-1317 * tableaux 1,2 * ---	1-6
X	EP 0 523 391 A (BEHRINGWERKE AG) 20 janvier 1993 (1993-01-20) * SEQ ID NO:4 * ---	1-6
X	EP 0 375 555 A (MEDGENIX GROUP SA) 27 juin 1990 (1990-06-27) * page 7, ligne 35 - ligne 37 * ---	1,2,4-6
X	WO 98 23635 A (AZOURY ZIADEH RANIA ;FRAZER IAN HECTOR (AU); CSL LTD (AU); TINDLE) 4 juin 1998 (1998-06-04) * figure 1, peptides GF51-GF53 * * figure 1 * ---	1-6
X	EP 0 257 754 A (UNIV LELAND STANFORD JUNIOR) 2 mars 1988 (1988-03-02) * page 3, ligne 21 * ---	1,2,4-6
-/--		
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
9 mai 2000		Cupido, M
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		
T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		

3

EPO FORM 1503 03.82 (P/MC13)

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	<p>RUPPERT J ET AL: "CLASS I MHC-PEPTIDE INTERACTION: STRUCTURAL AND FUNCTIONAL ASPECTS" BEHRING INSTITUTE: MITTEILUNGEN, DE, MARBURG, no. 94, 1 juillet 1994 (1994-07-01), pages 48-60, XP000604845 * page 57, colonne de gauche, dernier alinéa - colonne de droite *</p>	1,6
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.7)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
9 mai 2000		Cupido, M
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

3

EPO FORM 1503 03.92 (p4/C13)

THIS PAGE BLANK (USPTO)